

Limitierte Proteolyse von Eglin
durch Chymotrypsin
Studien zum Hemmechanismus von Eglin,
einem Protein-Proteinase-Inhibitor
aus dem Blutegel *Hirudo Medicinalis*

Anton Strobl

*Diss. München
1904*

Aus der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie
in der Chirurgischen Klinik der Universität München

Leitung: Professor Dr. Hans Fritz

LIMITIERTE PROTEOLYSE VON EGLIN DURCH CHYMOTRYPSIN
STUDIEN ZUM HEMMECHANISMUS VON EGLIN, EINEM PROTEIN-PRO-
TEINASE-INHIBITOR AUS DEM BLUTEGEL HIRUDO MEDICINALIS

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der ge-
samten Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Anton Strobl

aus

Ebertshausen, Gde. Sträßlach

1983

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
München

Berichterstatte:r: Prof. Dr. H. Fritz

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 28.02.1984

Diese Arbeit entstand an der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie in der Chirurgischen Klinik der Universität München unter Leitung von Professor Dr. Hans Fritz.

Meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Hans Fritz, danke ich für die Überlassung des Themas und die großzügige Unterstützung dieser Arbeit.

Besonders danken möchte ich Frau Dr. Ursula Seemüller, die mir stets hilfsbereiter Ansprechpartner war. Ihr fachliches Wissen und ihre Anregungen ermöglichten diese Arbeit.

Mein Dank gilt auch Frau Maria Meier für die praktische Unterstützung bei der Laborarbeit, sowie für das Tippen dieser Arbeit.

Herrn Dr. Eulitz von Institut für Immunologie und Klinische Hämatologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, München, danke ich für die Durchführung der Sequenzarbeiten.

These reports concern the activities of the German people in the German Reich and the German colonies. The reports are of a general nature and are not intended to provide a detailed account of the activities of the German people in the German Reich and the German colonies.

The reports are of a general nature and are not intended to provide a detailed account of the activities of the German people in the German Reich and the German colonies. The reports are of a general nature and are not intended to provide a detailed account of the activities of the German people in the German Reich and the German colonies.

The reports are of a general nature and are not intended to provide a detailed account of the activities of the German people in the German Reich and the German colonies. The reports are of a general nature and are not intended to provide a detailed account of the activities of the German people in the German Reich and the German colonies.

The reports are of a general nature and are not intended to provide a detailed account of the activities of the German people in the German Reich and the German colonies. The reports are of a general nature and are not intended to provide a detailed account of the activities of the German people in the German Reich and the German colonies.

The reports are of a general nature and are not intended to provide a detailed account of the activities of the German people in the German Reich and the German colonies. The reports are of a general nature and are not intended to provide a detailed account of the activities of the German people in the German Reich and the German colonies.

The reports are of a general nature and are not intended to provide a detailed account of the activities of the German people in the German Reich and the German colonies. The reports are of a general nature and are not intended to provide a detailed account of the activities of the German people in the German Reich and the German colonies.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A.	ZUSAMMENFASSUNG	1
B.	EINLEITUNG	2
B.1.	Definition von Protein-Proteinase-Inhibitoren	2
B.2.	Hemmechanismen der Serinproteinase-Inhibitoren ("Standard-Mechanismus")	2
B.3.	Limitierte Proteolyse	3
B.4.	Inhibitoren aus dem Blutegel	4
B.5.	Charakterisierung der Egline	4
B.6.	Aufgabenstellung	7
C.	MATERIAL UND METHODEN	8
C.1.	Apparate	8
C.1.1.	Photometer	8
C.1.2.	Säulenchromatographie	8
C.1.3.	Elektrophoresen	8
C.1.4.	Aminosäureanalysen	8

	Seite
C.2. Substanzen	9
C.2.1. Enzyme	9
C.2.2. Substrate	9
C.2.3. Säulenchromatographie	9
C.2.4. Polyacrylamid-Elektrophoresen	9
C.2.5. Andere Materialien	9
C.3. Methoden	10
C.3.1. Enzym- und Hemmtests	10
C.3.1.1. Trypsin	11
C.3.1.2. Chymotrypsin	11
C.3.2. Säulenchromatographie	11
C.3.3. Entsalzung	13
C.3.4. Proteinbestimmung	13
C.3.5. Elektrophoresen	13
C.3.5.1. Disk-Elektrophorese	13
C.3.5.2. SDS-Elektrophorese	13
C.3.6. Aminosäurenanalysen	14
C.3.7. Endgruppenbestimmung	14
C.3.8. Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_1	14
C.3.9. Dünnschichtchromatographische Peptiddetektion	15
D. ERGEBNISSE	16
D.1. Isolierung der Egline	16
D.2. Charakterisierung der Egline	19
D.3. Limitierte Proteolyse von Eglin c und Isolierung des C-terminalen Eglinfragmentes	24

III

Seite

D.3.1.	Inkubationsansätze	24
D.3.2.	Auftrennung des 1. Inkubationsansatzes	24
D.3.2.1.	Gelfiltration an Sephadex G-50	24
D.3.2.2.	Gelfiltration von Fraktion 1B an Biogel P6	27
D.3.3.	Auftrennung des 2. Inkubationsansatzes	27
D.3.3.1.	Gelfiltration an Sephadex G-50	27
D.3.3.2.	Auftrennung der Fraktion 2D an Biogel P6	31
D.4.	Charakterisierung der Eglinfragmente	34
D.4.1.	Aminosäurenanalyse	34
D.4.2.	Aufklärung der reaktiven Zentrums	34
D.4.3.	Sequenz von Eglinfragment 2	34
E.	DISKUSSION	37
E.1.	Zum Hemmechanismus von Eglin c	37
E.2.	Zu den experimentellen Ergebnissen	39
E.3.	Reaktives Zentrum, Vergleich mit anderen Proteinase-Inhibitoren	42
E.4.	Zur Sequenzaufklärung	44
F.	LITERATURVERZEICHNIS	45
	Lebenslauf	48

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

Ala	Alanin	Ile	Isoleucin
Arg	Arginin	Leu	Leucin
Asn	Asparagin	Lys	Lysin
Asp	Asparaginsäure	Pro	Prolin
Cys	Cystein	Ser	Serin
Gln	Glutamin	Thr	Threonin
Glu	Glutaminsäure	Tyr	Tyrosin
Gly	Glycin	Val	Valin

ATE	Antithrombin-Einheiten
Ac	Acetat
BAPA	N ^α -Benzoyl-L-arginin-4-nitroanilid
DEAE	Diäthylaminoäthyl-
HPTLC	high pressure thin layer chromatography
IU bzw. mIU	Inhibitor Unit bzw. milli-Inhibitor-Unit
U bzw. mU	Unit bzw. milli-Unit
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SUPHEPA	N ^α -Succinyl-L-phenylalanin-p-nitroanilid
TLCK	N-Tosyl-L-lysin-chloromethylketon
TPCK	N-Tosyl-L-phenylalanin-chloromethylketon
TRA	Triäthanolamin

A. ZUSAMMENFASSUNG

Bei der Interaktion des Proteinase-Inhibitors Eglin c aus dem Blutegel mit dem Enzym Chymotrypsin kann unter bestimmten Reaktionsbedingungen eine limitierte Proteolyse des Inhibitors erfolgen.

Es resultierten zwei Inhibitorfragmente:

- ein N-terminales Fragment (Aminosäureposition 1 - 45) und
- ein C-terminales Fragment (Aminosäureposition 46 - 70).

Das C-terminale Fragment wird bei der Komplexbildung abgespalten, während der N-terminale Teil des Eglin mit Chymotrypsin einen säurestabilen Komplex bildet, der auch in der SDS-Elektrophorese nicht dissoziiert. Das C-terminale Fragment wurde in zwei Gelchromatographieschritten isoliert und eingehend charakterisiert. Die Sequenzierung führte zur Aufklärung der bis dahin noch fraglichen sequentiellen Zuordnung der Position 48 - 53 im Eglinmolekül.

Die Peptidbindung Leu-Asp in Position 45 - 46 des Eglinmoleküls konnte als Bindung des reaktiven Zentrums identifiziert werden.

Der Vergleich von Eglin c mit anderen Chymotrypsin-Inhibitoren ergibt eine bemerkenswerte Übereinstimmung in der Aminosäurezusammensetzung vor allem im Bereich des reaktiven Zentrums.



B. EINLEITUNG

B.1. Definition von Protein-Proteinase-Inhibitoren

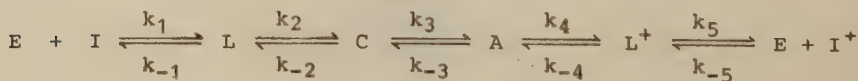
Protein-Proteinase-Inhibitoren sind Proteine, die mit einer oder mehreren Proteinasen reversible, stöchiometrische Komplexe bilden, in denen alle katalytischen Funktionen des Enzyms kompetitiv gehemmt sind (1). Eine Ausnahme von dieser Definition machen die hochmolekularen Plasmainhibitoren, da diese auch irreversible Komplexe zu bilden vermögen.

Die Komplexbildung zwischen Enzym und Inhibitor erfolgt u.a. unter Beteiligung des aktiven Zentrums der Proteinase (im Falle der Serinproteinasen ein Serinrest) und des reaktiven Zentrums des Inhibitors (in der Regel eine Aminosäure, die der Substratspezifität der inhibierten Proteinase entspricht).

B.2. Hemmechanismus der Serinproteinase-Inhibitoren ("Standard-Mechanismus")

Im folgenden soll der Hemmechanismus der Serinproteinasen näher dargestellt werden, da dies in engem Zusammenhang mit der Problemstellung der vorliegenden Dissertation steht.

Für die Reaktion zwischen Serinproteinase und Inhibitor wurde folgender Mechanismus formuliert (2 - 4):



Dabei bedeutet: E = Enzym, I = Inhibitor, I^+ = modifizierter Inhibitor (Peptidbindung des reaktiven Zentrums $P_1 - P_1$, hydrolysiert), L = Komplexvorstufe aus $E + I$, L^+ = Komplexvorstufe aus $E + I^+$, A = Acyl-enzymkomplex (kovalenter Komplex).

Die Bezeichnung der Aminosäuren (P_1) im reaktiven Zentrum des Inhibitors erfolgt nach Schechter und Berger(5):

$NH_2 - P_x \dots P_2 - P_1 - P_1 - P_2 \dots P_x - COOH$, wobei $P_1 - P_1$, die Peptidbindung des reaktiven Zentrums darstellt.

Enzym und Inhibitor reagieren zu einem stabilen Enzym-Inhibitor-Komplex (C), der als eine nichtkovalente Verbindung identifiziert wurde (6-8). Der Kontaktbereich der beiden Proteine im Komplex beschränkt sich dabei nicht nur auf das aktive Zentrum des Enzyms und das reaktive Zentrum des Inhibitors, sondern schließt andere komplementäre Strukturteile ein (9). In einer substratanalogen Reaktion kann der Komplex weiterreagieren. Die mit dieser Reaktion verbundene Hydrolyse der Peptidbindung $P_1 - P_1$ im reaktiven Zentrum des Inhibitors führt zur Bildung des modifizierten Inhibitors. Der modifizierte Inhibitor ist ebenfalls voll aktiv, die Komplexbildung mit dem Enzym erfolgt aber im Gegensatz zum nativen Inhibitor sehr viel langsamer.

B.3. Limitierte Proteolyse

Man bezeichnet die Spaltung der $P_1 - P_1$ -Peptidbindung im reaktiven Zentrum auch als limitierte Proteolyse, eine auf eine oder wenige spezifische Peptidbindungen begrenzte proteolytische Spaltung (10). Die limitierte Proteolyse ist ein universeller Mechanismus der Natur, um essentielle physiologische Prozesse im lebenden Organismus zu regulieren. Als Beispiele seien genannt:

- die Regulation der Nierenfunktion über vasoaktive Peptide (Angiotensin II, Kinine) (11),

- die Vorgänge bei Fibrinbildung und Fibrinolyse im Blutgerinnungsgeschehen (12),
- die Freisetzung von Kininen durch Kallikrein (11),
- der Inhibitionsmechanismus des α_2 -Makroglobulins (13 - 15).

B.4. Inhibitoren aus dem Blutegel

Aus dem Blutegel *Hirudo medicinalis* wurden bisher 3 Gruppen von Protein-Proteinase-Inhibitoren isoliert:

- Hirudin - Thrombin-spezifischer Inhibitor, bestehend aus 67 Aminosäuren, isoliert und charakterisiert von Markwardt et al.; Sequenz aufgeklärt von Petersen et al. (10) bzw. Dodt (17);
- Bdelline - Trypsin-Plasmin-Inhibitoren; Struktur von Bdellin B₃ von Krejci und Fritz partiell aufgeklärt (18,19);
- Egline - isoliert und charakterisiert von Seemüller et al. (20,21), s. B.5. .

B.5. Charakterisierung der Egline

Eglin b und Eglin c sind Isoinhibitoren mit einem Molekulargewicht von 8 073 bzw. 8 099, bestehend aus 70 Aminosäuren. Die Primärstruktur von Eglin c ist aufgeklärt (22). Dabei trug die vorliegende Arbeit zur Sequenzaufklärung der noch fraglichen Positionen 48 - 53 bei.

Untersuchungen zum Hemmspektrum der Egline ergaben eine sehr starke Hemmung von Chymotrypsin, Subtilisin und den menschlichen Granulozytenproteinasen Elastase und Kathepsin G. Die Dissoziationskonstanten für diese Enzym-Inhibitor-Komplexe liegen im Bereich von

10^{-10} M (23). Die Eglise gehören damit zu den stärksten Inhibitoren der menschlichen granulocytären Elastase und des Kathepsin G, die bisher gefunden wurden.

Als ein interessantes Ergebnis stellte sich heraus, daß die Eglise weder Cystin noch Cystein enthalten. Dieses Resultat ist insofern überraschend, als die meisten bekannten, natürlich vorkommenden Serinproteinase-Inhibitoren (ausgenommen die Plasma-Inhibitoren) einen relativ hohen Gehalt an Cystin besitzen. Dieses Strukturmerkmal ist hauptsächlich für die Stabilität dieser Proteinklasse verantwortlich und wird in Zusammenhang mit der biologischen Wirkung der Inhibitoren diskutiert.

Für die meisten untersuchten Inhibitorproteine konnte nachgewiesen werden, daß das reaktive Zentrum in einem sog. Disulfid-loop lokalisiert ist und somit einen sehr rigiden Strukturbereich darstellt. Dies führt dazu, daß trotz proteolytischer Spaltung der Peptidbindung im reaktiven Zentrum die Ketten in ihrer räumlichen Anordnung fixiert bleiben, und der sog. modifizierte Inhibitor ebenfalls hemmaktiv ist (10,24).

Da sich die Eglise in ihrer Struktur von den meisten bekannten Protein-Proteinase-Inhibitoren signifikant unterscheiden, wurden Untersuchungen zur Klärung des Hemmechanismus unternommen. Als Reaktionsmodell wurde die Interaktion zwischen Eglin c und Chymotrypsin herangezogen. Eglin c und Chymotrypsin wurden in unterschiedlichen molaren Konzentrationen inkubiert und die Inkubationsansätze in SDS-Elektrophoresen analysiert (Abb.1).

Die Versuchsergebnisse führten zu folgender Hypothese:

1. Eglin bildet mit Chymotrypsin einen stabilen Enzym-Inhibitor-Komplex, der in der SDS-Elektrophorese nicht dissoziierbar ist.
2. Bei der Komplexreaktion erfolgt eine limitierte Proteolyse, die die Abspaltung eines Peptids zur Folge hat.

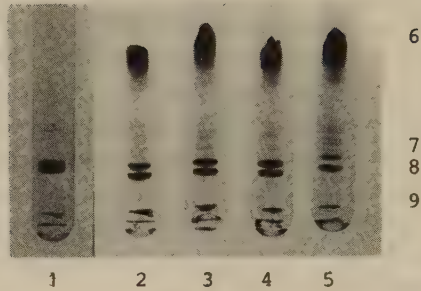


Abb.1 SDS-elektrophoretische Auftrennung des
Inkubationsansatzes von Eglin c mit
50 Mol% Chymotrypsin bei pH 7,8

- 1 natives Eglin c
- 2 5 Minuten Inkubation
- 3 2 Stunden Inkubation
- 4 24 Stunden Inkubation
- 5 48 Stunden Inkubation
- 6 Komplexbande
- 7 natives Eglin c
- 8 Eglinfragment
- 9 Marker zur Lauffrontmarkierung

B.6. Aufgabenstellung

Die Anregung zur vorliegenden Arbeit resultierte aus der aufgestellten Hypothese, daß bei der Interaktion zwischen Eglin und Chymotrypsin eine limitierte Proteolyse unter Abspaltung eines Peptids aus dem Inhibitormolekül erfolgt. Dieser Mechanismus wird ebenfalls für die Plasmainhibitoren (α_1 -Proteinase-Inhibitor, C1-Inhibitor, Antithrombin III) postuliert.

Meine Aufgabe bestand in der Isolierung und Identifizierung des Eglinfragmentes, das aus der Reaktion des Inhibitors mit Chymotrypsin hervorgeht. Damit sollte der hypothetische Hemmechanismus der Egline bestätigt werden.

Die Charakterisierung des abgespaltenen Eglinfragmentes sollte auch zur Identifizierung des reaktiven Zentrums im Eglinmolekül führen.

C. MATERIAL UND METHODEN

C.1. Apparate

C.1.1. Photometer

Für kinetische Enzymmessungen bei 405 nm: Eppendorf 1101 mit Kienzle-Drucker 624. Für Messungen bei anderen Wellenlängen: Zeiss Spektralphotometer PMQ3, ebenfalls mit Kienzle Drucker.

C.1.2. Säulenchromatographie

Die optische Dichte der Säuleneluate für die Eglinisolierung wurde bei 256 bzw. 280 nm mit dem Durchflußphotometer Uvicord II der Firma LKB gemessen; die Eluate wurden automatisch mit dem Gilson Fraktionssammler fraktioniert. Die Trennung der Eglinfragmente wurde mit einem Durchflußphotometer Uvicord III der Firma LKB detektiert. Der Uvicord III bietet die Möglichkeit bei zwei Wellenlängen, nämlich 206 und 276 nm, simultan zu messen und so auch kurzketige Peptide zu registrieren. Die Durchflußgeschwindigkeiten wurden mit Perpex-Pumpen von LKB mit austauschbarem Getriebe reguliert.

C.1.3. Elektrophoresen

Rundgel-Elektrophoresekammer von Shandon mit Glasröhrchen 75 x 4,5 mm, Spannungsgerät Typ 3371 von LKB.

C.1.4. Aminosäureanalysen

Durum D 500

C.2. Substanzen

C.2.1. Enzyme

Rinderpankreas-Trypsin, TPCK-behandelt (Art. Nr. 24581) und Rinder-Chymotrypsin, TLCK-behandelt (Art. Nr. 2308) von Merck, Darmstadt; α -Chymotrypsin Nr. C-3142 aus Rinderpankreas von SIGMA-Chemie;

C.2.2. Substrate

N^α-Benzoyl-L-arginin-p-nitroanilid (BAPA), Art. Nr. 10754 und N^α-Succinyl-L-phenylalanin-p-nitroanilid (SUPHEPA), Art. Nr. 15070, Merck, Darmstadt;

C.2.3. Säulenchromatographie

Sephadex G-75 medium (Art. Nr. 9065), Sephadex G-50 fine (Art. Nr. 2123) und SP-Sephadex C-25 (Art. Nr. 7127), Pharmacia, Uppsala, Schweden; DEAE-Cellulose DE 52 (Art. Nr. 24521), Whatman, Kent; Fractogel PGM 2000 (Art. Nr. 9398), Merck, Darmstadt; Biogel P6 (Art. Nr. 1500750), Bio-Rad Laboratories, Richmond;

C.2.4. Polyacrylamid-Elektrophoresen

Acrylamid (Art. Nr. 10675), N,N'-Methylenbisacrylamid (Art. Nr. 29195), Serva, Heidelberg; N,N,N',N'-Tetramethylenäthylendiamin (Art. Nr. 808742), Merck-Schuchardt; Dithiothreitol (Art. Nr. 161-0611), Bio-Rad Laboratories, Richmond; Natriumdodecylsulfat (Art. Nr. 1610300), Bio-Rad Laboratories, Richmond; Coomassie Brilliant Blue R-250 (Art. Nr. 17525), Serva, Heidelberg;

C.2.5. Andere Materialien

Fluram (Art. Nr. 21551), Serva, Heidelberg; Micro-Polyamid-Platten F 1700 (Art. Nr. 356000), Schleicher und Schüll, Dassel;

des Enzyms mit dem Inhibitor in dem entsprechenden Puffer für 5 Minuten vor Substratzugabe.

Die Enzyme Trypsin und Chymotrypsin wurden unter folgenden Testbedingungen verwendet:

C.3.1.1. Trypsin

0,1 ml Trypsinlösung (10 mg/100 ml in 0,0025 N HCl), (1,9 - x) ml TRA-Puffer (0,2 M, pH 7,8) und x ml Inhibitorlösung werden 5 Minuten bei 25°C inkubiert und die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 1 ml L-BAPA-Lösung (50 mg/100 ml dest. Wasser) gestartet. Die Substrathydrolyse wird durch Messung der Extinktionsänderung pro Minute bei 405 nm verfolgt. Die Extinktionsänderung von 0,00332 pro Minute entspricht einer Enzymaktivität von 1 mU. Die Verminderung der Extinktionsänderung von 0,00332 pro Minute entspricht einer Inhibitoraktivität von 1 mIU.

C.3.1.2. Chymotrypsin

0,1 ml Chymotrypsinlösung (200 ug/ml in 0,0025 N HCl), (1,9 - x) ml 0,2 M TRA, 0,02 M CaCl_2 Puffer, pH 7,8, x ml Inhibitorlösung, Substrat: SUPHEPA (2,5 mg/ml in TRA-Puffer, pH 7,8; sonstige Bedingungen s.o.

Abbildung 2 zeigt die Aktivitätsbestimmung von Chymotrypsin, Abbildung 3 die Hemmung von Chymotrypsin mit dem Blutegelrohextrakt.

C.3.2. Säulenchromatographie

Die Isolierung der Eglone erfolgte mittels Gelfiltration und Ionenaustauschchromatographie, die Isolierung der Eglinfragmente mittels Gelfiltration. Experimentelle Details werden unter den einzelnen Abbildungen angegeben.

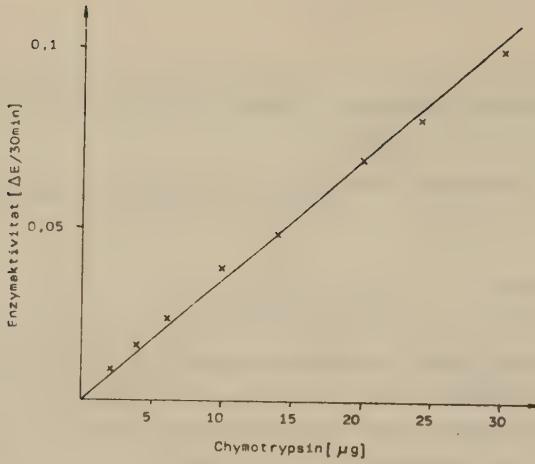


Abb.2 Aktivitätsbestimmung von Chymotrypsin mit SUPHEPA als Substrat

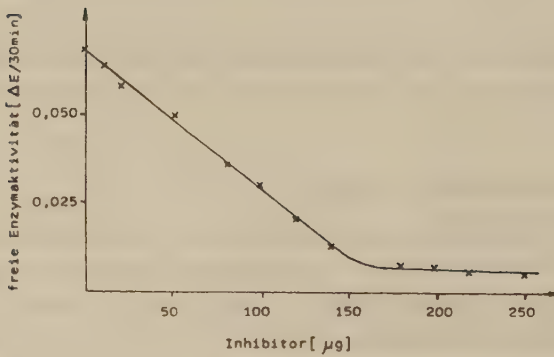


Abb.3 Hemmung von Chymotrypsin mit dem Blutegel-rohextrakt als Inhibitor; Substrat: SUPHEPA

C.3.3. Entsalzung

Die gepoolten Eluate aus den einzelnen Trennschritten wurden mittels Gelfiltration über eine Säule mit Sephadex C-25, Fractogel PGM-2000, bzw. Biogel P 6 als Matrix oder mittels Ultrafiltration entsalzt.

C.3.4. Proteinbestimmung

Es wurde die quantitative Proteinbestimmungsmethode nach Folin-Ciocalteu durchgeführt. Die Empfindlichkeit der Methode liegt im Bereich 5 - 50 µg. Die Proteinbestimmung erfolgte an Hand einer Eichkurve, erstellt mit Rinderserum-Albumin.

C.3.5. Elektrophoresen

Sämtliche Rundgel-Elektrophoresen wurden in einer Shandon-Disk-Elektrophoresekammer mit 4,4 x 75 mm Glasröhrchen ausgeführt. Die Probenmenge betrug jeweils ca. 10 - 15 µg Protein/Röhrchen. Die Anfärbung der Gele erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue (27), entfärbt wurde mit Methanol/Eisessig/Wasser (50:75:875).

C.3.5.1. Disk-Elektrophorese

Es wurden 10%ige Polyacrylamidgele, pH 4,3, verwendet. Die Gel-systeme entsprachen mit geringen Änderungen den Gelsystemen 2 bzw. 8 nach Maurer (28).

Die Trennung erfolgte bei 4°C, die Stromstärke lag bei 5 mA/Röhrchen, ein Lauf dauerte zwischen 60 und 100 Minuten. Als Marker wurde Methylgrün eingesetzt, die Markerfront mit Chinatusche markiert.

C.3.5.2. SDS-Elektrophorese

Die SDS-Elektrophorese erfolgte in 15%igen Polyacrylamidgelen nach Weber und Osborn (29). Als Marker wurde Bromphenolblau verwendet. Zur Molekulargewichtsbestimmung wurden folgende Referenzproteine eingesetzt: Rinderserumalbumin (Mr 68 000), Chymotryp-

sin (Mr 23 700), Ribonuclease (Mr 13 700), Trasylol (Mr 6 500), Insulin red. (Mr ~ 3 000). Reduziert wurde mit Dithiothreitol für 5 Minuten bei 100°C.

C.3.6. Aminosäuren-Analysen (30)

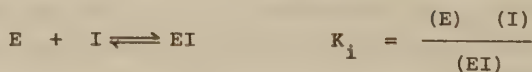
Die Proteinproben wurden in 6 N HCl bei 110°C für 20 und 72 Stunden unter Vakuum hydrolysiert. Die Aminosäurenanalysen wurden am Durrum D 500 Analyzer durchgeführt.

C.3.7. Endgruppenbestimmung

Die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuren erfolgte mittels Dansyltechnik (31). Die Empfindlichkeit dieser Methode liegt im Bereich 0,2 - 1 nMol.

C.3.8. Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_i (32)

Sie wurde nach dem von Green und Work beschriebenen Näherungsverfahren durchgeführt. Dabei wird die Aktivitätsabnahme einer konstanten Enzymmenge bei steigender Inhibitorkonzentration gemessen und die Meßwerte in einer Titrationskurve graphisch dargestellt (Ordinate: Enzymaktivität; Abszisse: Inhibitorkonzentration). Über die lineare Regression wird der Äquivalenzpunkt graphisch ermittelt. Bei Kenntnis der Enzymmolarität im Testansatz läßt sich unter Verwendung des Massenwirkungsgesetzes folgende Formel erstellen:



im Äquivalenzpunkt gilt:

$$E_{\text{frei}} = I_{\text{frei}}$$

$$EI = E_{\text{total}} - E_{\text{frei}}$$

daraus folgt:

$$K_i = \frac{(E)_{\text{frei}}^2}{(E)_{\text{total}} - (E)_{\text{frei}}}$$

C.3.9. Dünnschichtchromatographische Peptiddetektion (33)

Peptidaliquote (0,1 - 1 nMol) wurden in geringem Volumen (ca. 5 μ l) auf eine HPTLC-Platte (Merck) aufgetragen und in einem Fließmittel (Methanol/Chloroform/25% Ammoniak, 40:40:20) getrennt. Nach dem Trocknen bei 110°C für 30 Minuten wurde die abgekühlte Platte mit einer Fluramlösung (8,25 mg Fluram in 250 ml Aceton) bestrichen. Die Peptide sind nach dem Verdunsten des Acetons unter UV-Licht bei 365 nm sichtbar.

D. ERGEBNISSE

D.1. Isolierung der Eglone

Die Isolierung der Eglone erfolgte nach dem von Seemüller et al. ausgearbeiteten Isolierungsschema (Abb.4).

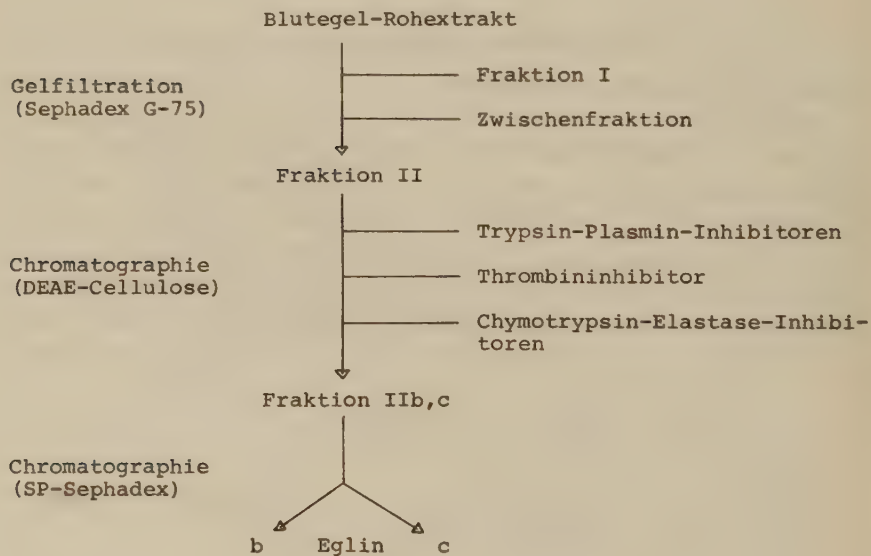


Abb.4 Isolierungsschema der Eglone aus Blutegel-Rohextrakt

Die Fraktionierung der Eluate der säulenchromatographischen Trennungen wurde aufgrund der Hemmaktivität gegenüber Trypsin und Chymotrypsin vorgenommen.

Gelfiltration an Sephadex G-75 (Abb.5)

Im ersten Reinigungsschritt wurde der lyophilisierte Blutegel-rohextrakt mittels Gelfiltration aufgetrennt und in 3 Fraktionen (Fraktion I, Zwischenfraktion, Fraktion II) eingeteilt. Fraktion II enthält u.a. die Eglin.

Ionenaustauschchromatographie

Im zweiten Reinigungsschritt wurde die Fraktion II einer Anionenaustauschchromatographie bei pH 6,5 unterworfen (Abb.6). Der größte Teil der Chymotrypsinhemmaktivität wurde in einer als IIb,c bezeichneten Fraktion eluiert. Die abschließende Feinreinigung und Trennung der Fraktion IIb,c, die die beiden Isoinhibitoren Eglin b und Eglin c enthält, gelingt mittels einer Kationenaustauschchromatographie bei pH 5,5 (Abb.7). Die beiden Hemmstoffe werden in zwei symmetrischen, klar voneinander getrennten Fraktionen eluiert.

Ausbeute

Die Reinigung der Eglin ergab eine Anreicherung der Inhibitoraktivität um den Faktor 33 (Tab.1).

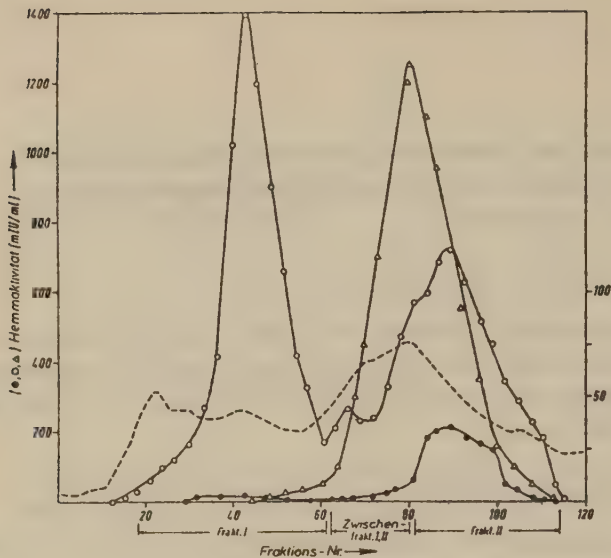


Abb. 5 Gelfiltration des Blutegel-Rohextraktes an Sephadex G-75

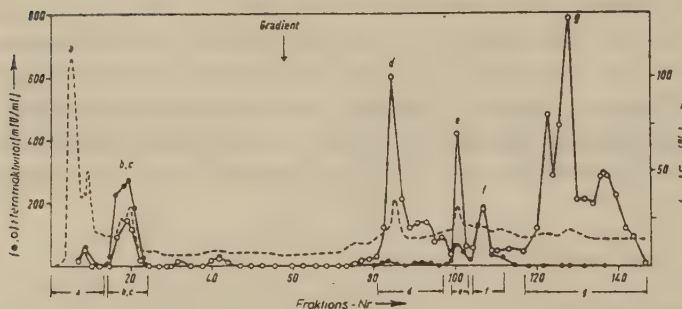


Abb. 6 Anionenaustauschchromatographie der Fraktion II an DEAE-Cellulose

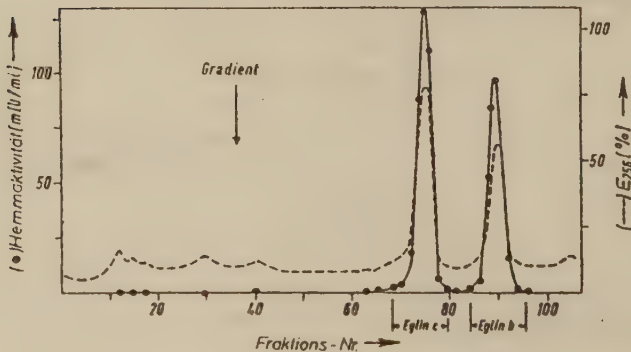


Abb. 7 Kationenaustauschchromatographie der Fraktion IIb, c an SP-Sephadex

- Extinktion bei 256 nm
- ○ Hemmaktivität gegen Trypsin
- ● Hemmaktivität gegen Chymotrypsin
- △ △ Hemmaktivität gegen Thrombin

Tab.1 Inhibitoraktivitäts-Ausbeute und spezifische Inhibitoraktivität gegen Chymotrypsin nach den einzelnen Isolierungsschritten

Isolierungsschritt	Ausbeute an Inhibitor- aktivität %	Fraktion	spez. Inhi- bitorakt. (mIU/mg)
Gelfiltration an Sephadex G-75	92	Ausgangs- material	4,4
Chromatographie (DEAE-Cellulose)	73	Fraktion II	12,2
Chromatographie (SP-Sephadex)	70	Eglin b Eglin c	141 150

D.2. Charakterisierung der Egline

Disk-Elektrophorese

Mittels einer Disk-Elektrophorese bei pH 4,3 (Abb.8) wurde demonstriert, daß das Material (FIIb,c) aus der DEAE-Chromatographie eine Mischung aus Eglin b und Eglin c enthält, die durch die SP-Sephadex-Chromatographie vollständig in die beiden Komponenten aufgetrennt wird.

SDS-Elektrophorese

Der Vergleich der Banden und Wanderstrecken von reduziertem und nicht reduziertem Eglin zeigt, daß es sich beim Eglin um ein einkettiges Molekül handelt. Bei Vorhandensein einer weiteren Kette, verbunden durch Disulfidbrücken, würde sich nach Reduktion eine zweite Bande ergeben.



Abb.8 Disk-Elektrophorese, pH 4,3

- 1 Fraktion IIb,c nach Chromatographie an DEAE-Cellulose
- 2 Eglin b nach Chromatographie an SP-Sephadex
- 3 Eglin c nach Chromatographie an SP-Sephadex
- 4 Marker zur Lauffrontmarkierung

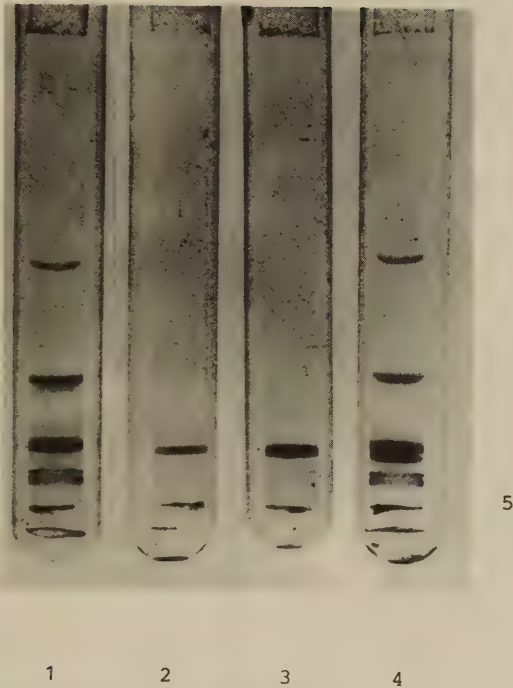


Abb.9 SDS-Elektrophorese

- 1 Markerproteine
- 2 Eglin c
- 3 Eglin c reduziert
- 4 Markerproteine + Eglin c reduziert
- 5 Marker zur Lauffrontmarkierung

Aminosäurenanalyse

Das Ergebnis der Aminosäurenanalyse ist in Tab.2 wiedergegeben. Die auffälligste Beobachtung ist das Fehlen von Cystein-Resten im Eglin-Molekül. Bemerkenswert auch das Fehlen von Isoleucin und Methionin und der relativ hohe Gehalt an Valin, Tyrosin und Phenylalanin.

Tab.2 Aminosäurezusammensetzung von Eglin b und Eglin c

	Eglin b		AS/Mol	Eglin c		AS/Mol
	20 h	72 h		20 h	72 h	
Asp	6,84	6,70	7	7,00	6,93	7
Thr	4,57	4,22	5	4,60	4,30	5
Ser	3,30	3,30	3	3,07	2,80	3
Glu	7,06	6,84	7	7,01	6,98	7
Pro	5,52	5,58	6	5,77	5,85	6
Gly	5,02	5,22	5	5,01	5,05	5
Ala	1,48	1,49	1	1,24	1,34	1
Cys						
Val	9,01	9,99	11	8,37	10,00	11
Met						
Ile						
Leu	5,00	5,13	5	5,01	4,92	5
Tyr	4,29	3,86	4-5	5,09	4,57	6
Phe	5,17	4,95	5	5,16	4,90	5
His	3,68	3,82	4	2,84	2,88	3
Lys	2,22	2,18	2	2,02	2,07	2
Arg	3,78	3,62	4	3,70	4,00	4
Gesamt			70			70
M _r			8 073			8 099
N-Terminus	Thr			Thr		

Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_i

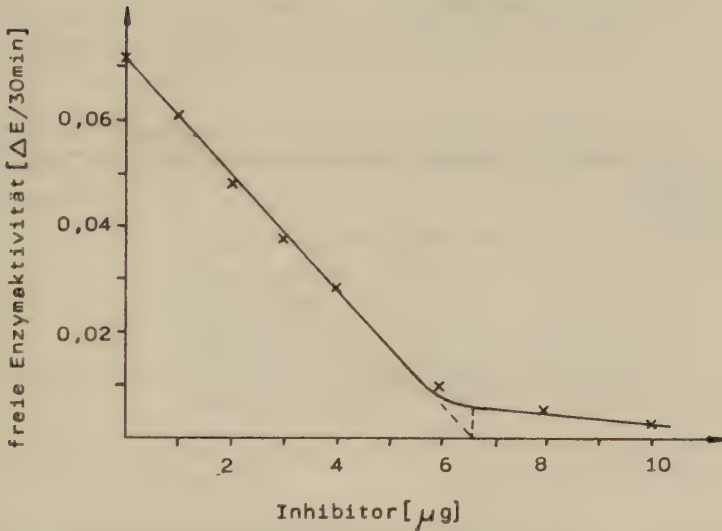


Abb.10 Titration von Chymotrypsin mit Eglin c

Substrat: SUPHEPA

Chymotrypsin: 0,5 nMol/3 ml Testvolumen

Für Eglin c konnte folgender K_i -Wert ermittelt werden:

$$K_i = 2,7 \text{ (nMol/l)}$$

Aus dem molaren Verhältnis von eingesetzter Enzym- und Inhibitor-konzentration errechnet sich aus der Titrationskurve (Abb.10) die Bildung eines äquimolaren Komplexes zwischen Eglin und Chymo-trypsin.

Homogenität

Die Homogenität von Eglin b und c ergibt sich aus den oben dargestellten experimentellen Kriterien:

1. Symmetrie der Inhibitorkurven im Elutionsprofil (Chromatographie an SP-Sephadex) (Abb.7)
2. Eine Proteinbande in Disk- und SDS-Elektrophorese (Abb.8 und (Abb.9)
3. Ergebnis der Endgruppenbestimmung: Als einzige N-terminale Endgruppe ergab die Dansylierungsmethode für beide Eglime Threonin.
4. Ergebnis der Aminosäurenanalyse (Tab.2)

D.3. Limitierte Proteolyse von Eglin c und Isolierung des C-terminalen Eglinfragmentes

D.3.1. Inkubationsansätze

Für die folgenden Inkubationsansätze wurde die Eglin c-Präparation verwendet, deren Isolierung und Charakterisierung im vorangehenden Teil der Arbeit beschrieben ist.

Eglin c und Chymotrypsin wurden im molaren Verhältnis 2:1 inkubiert. Zwei unterschiedliche Ansätze (Tab.3) und Trennbedingungen (Abb.13,16) führten zur Isolierung eines nach Endgruppe und Aminosäurezusammensetzung identischen Peptids.

D.3.2. Auftrennung des 1. Inkubationsansatzes

D.3.2.1. Gelfiltration an Sephadex G-50

Die Auftrennung des 1. Inkubationsansatzes durch Gelfiltration erfolgte im Alkalischen (Abb.11): Nach Austestung mittels dünn-schichtchromatographischer Peptiddetektion wurde eine Einteilung

Tab.3 Vergleich der Bedingungen der beiden Inkubationsansätze für die limitierte Proteolyse von Eglin c

	1. Ansatz	2. Ansatz	
Chymotrypsin	290 nMol (218 mU)	417 nMol (314 mU)	
Eglin c	600 nMol (360 mIU)	940 nMol (651 mIU)	
Komplex	159 mIU	238 mIU	überschüssige Hemmaktivität im Inkubationsansatz
	0,02 M CaCl ₂ 0,2 M TRA, pH 7,8	0,02 M CaCl ₂ pH 7,5	Puffer
	5 Stunden	1,5 Stunden	Inkubationszeit
	Abb.13	Abb.16	Isolierungsschema

in 5 Fraktionen (1A, 1B, 1C, 1D, 1E) vorgenommen. Die Charakterisierung der Fraktionen erfolgte nach Entsalzung an einer Biogel P 6-Säule in 10%iger Essigsäure.

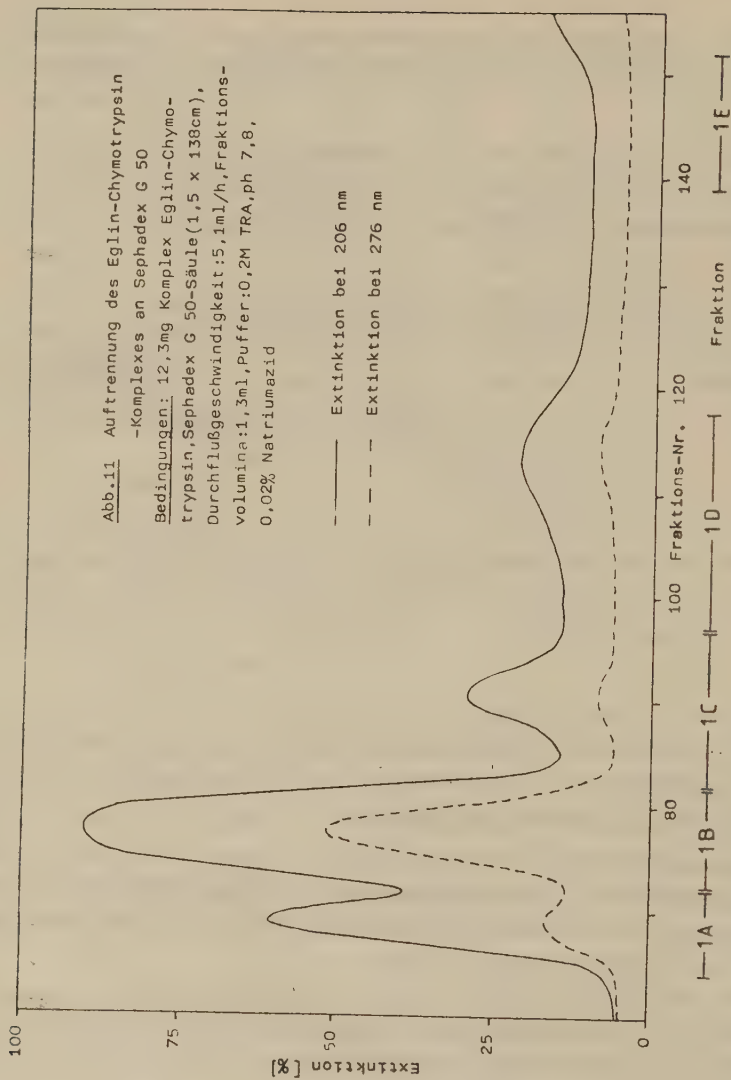
Fraktion 1A trennte sich bei der gelchromatographischen Entsalzung an Biogel P 6 in 3 Fraktionen auf (1A1, 1A2, 1A3).

Fraktion 1A2 enthielt Hemmaktivität (25 mIU), 1A1 und 1A3 wurden nicht näher charakterisiert.

Auftrennung der Fraktion 1B siehe unter D.3.2.2.

Fraktion 1C konnte mittels Endgruppenbestimmung (Thr), Aminosäurenanalyse und Hemmaktivitätsbestimmung (56 mIU) als natives Eglin identifiziert werden.

Fraktion 1D wurde in 2 Fraktionen, 1D1 und 1D2, aufgetrennt, mit den Endgruppen Thr für 1D1 und Asp für 1D2. Die Aminosäurenanalyse erlaubte keine eindeutige Identifizierung von Eglinfragmenten.



Fraktion E1 mit kleinerem Molekulargewicht wurde nicht näher untersucht.

D.3.2.2. Gelfiltration von Fraktion 1B an Biogel P6

Die Entsalzung der Fraktion 1B ergab eine Auftrennung in vier Fraktionen: 1B1, 1B2, 1B3, 1B4 (Abb.12).

Fraktion 1B1 (4,13 mg) enthielt chymotryptische Aktivität (95 mU); es dürfte sich um Chymotrypsin handeln.

Fraktion 1B2 (Endgruppe: Thr, 74 mIU Hemmaktivität) enthielt natives Eglin.

Fraktion 1B3 zeigte nach Endgruppe (Thr) und Aminosäureanalyse Übereinstimmung mit Position 1 - 45 der Aminosäuresequenz des Eglinmoleküls.

Die Endgruppenbestimmung der Fraktion 1B4 ergab Asp, die Aminosäureanalyse Übereinstimmung mit der Aminosäurezusammensetzung der Position 46 - 70 des Eglinmoleküls.

D.3.3. Auftrennung des 2. Inkubationsansatzes

D.3.3.1. Gelfiltration an Sephadex G-50

Die Auftrennung des 2. Inkubationsansatzes durch Gelfiltration erfolgte im Sauren (Abb.14). Absorptionskurve, Chymotrypsin-Hemmaktivität und dünnschichtchromatographische Peptiddetektion ließen eine Einteilung in sechs Fraktionen - 2A - 2F - vornehmen.

Fraktion 2A enthielt geringe Chymotrypsinaktivität, wurde aber nicht näher identifiziert.

Fraktion 2B wurde an Biogel P6, 10% HAc, in drei Fraktionen - 2B1, 2B2, 2B3 - aufgetrennt. Fraktion 2B1 enthielt Enzymaktivität, 2B2 Hemmaktivität (164 mIU), 2B3 Asp und Thr in der Endgruppenbestimmung. Eine nähere Charakterisierung fand nicht statt.

Die Aminosäureanalyse der Fraktion 2C stimmte näherungsweise mit der Aminosäurezusammensetzung von Eglin c überein. Für eine Verunreinigung spricht das Auffinden von Asp neben Thr bei der Endgruppenbestimmung.

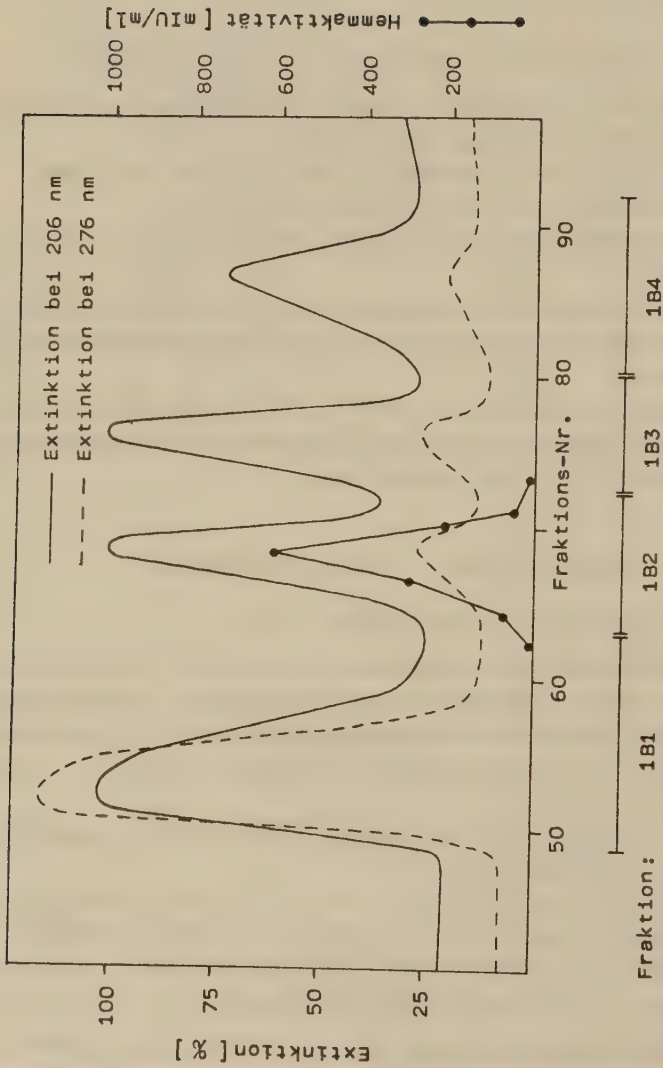


Abb.12 Auftrennung der Fraktion 1B an Biogel P6

Bedingungen: Fraktion 1B wurde auf eine Biogel P6-Säule (0,9 x 94 cm) gegeben. Durchflusgeschwindigkeit: 0,7 ml/h; Fraktionsvolumen: 0,3 ml; Puffer: 10% HAC;

1. Inkubationsansatz
Eglin-Chymotrypsin
(159 mIU)

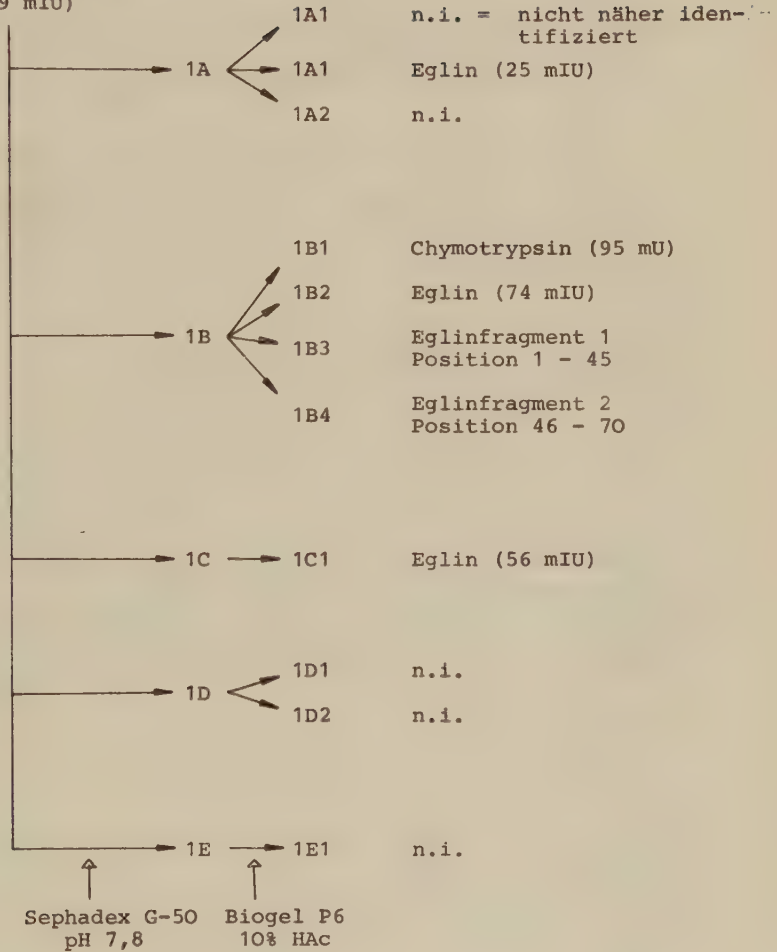


Abb.13 Auftrennungsschema des 1. Inkubationsansatzes

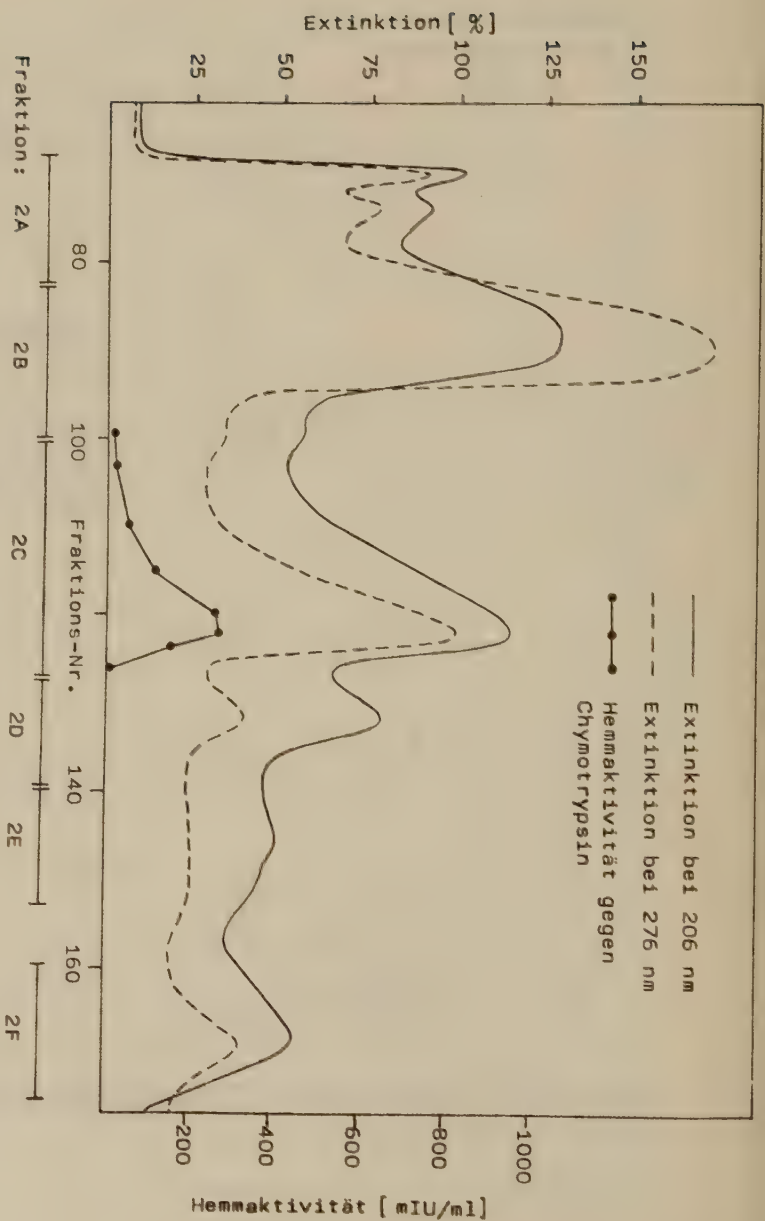


Abb. 14

Auftrennung des Eglin-Chymotrypsin-Komplexes an Sephadex G-50

Bedingungen:

18,4 mg Komplex, lyophilisiert, wurde auf eine Sephadex G-50-Säule (1,5 x 140 cm) aufgetragen. Durchfließgeschwindigkeit: 5,7 ml/h; Fraktionsvolumen: 1,4 ml; Puffer: 0,1 M HAc, pH 2,9;

Über die weitere Auftrennung und Identifizierung der Fraktion 2D siehe unter D.3.3.2.

Fraktion 2E und 2F, die nur geringe Peptidmengen enthielten, waren unsauber nach den Kriterien der Endgruppenbestimmung und Aminosäurenanalyse, eine weitere Identifizierung wurde nicht durchgeführt.

D.3.3.2. Auftrennung der Fraktion 2D an Biogel P6

Fraktion 2D enthielt als Endgruppe sowohl Thr als auch Asp, die Aminosäurenanalyse ermöglichte keine eindeutige Zuordnung. Es erfolgte deshalb eine Rechromatographie an Biogel P6 (Abb.15).

Die Einteilung in drei Fraktionen - 2D1, 2D2, 2D3 - erfolgte über dünnschichtchromatographische Detektion. Fraktion 2D2 und 2D3 mit einer Molekülgröße von weniger als 25 Aminosäuren konnten nicht weiter zugeordnet werden.

Fraktion 2D1 enthielt als einzige N-terminale Aminosäure Asp, die Aminosäurenanalyse ergab fast identische Werte mit Fraktion 1B4 (40 nMol) aus dem 1. Inkubationsansatz (Ausbeute ca. 90 nMol) und ermöglichte eine Zuordnung zur Aminosäurezusammensetzung der Position 46.- 70 des Eglin c-Moleküls. Als N-terminale Aminosäure dieses als Eglinfragment 2 bezeichneten Peptids wurde Asp gefunden. Abb.16 zeigt die Auftrennung des 2. Inkubationsansatzes schematisch.

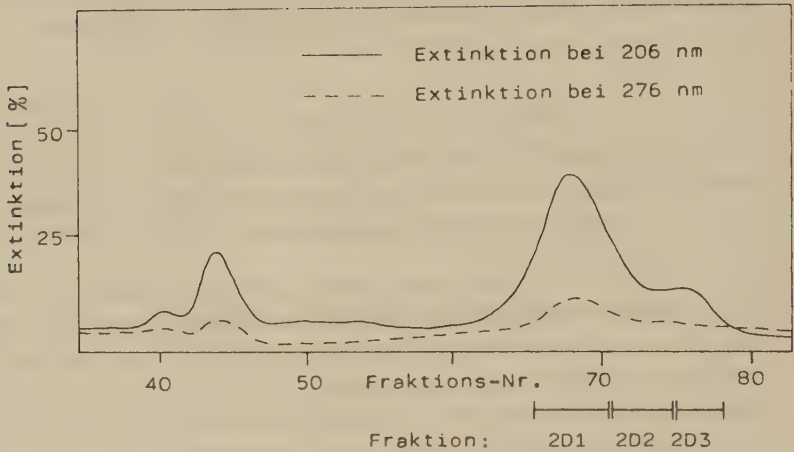


Abb.15 Auftrennung der Fraktion 2D an Biogel P6

Bedingungen: Fraktion 2D (800 ng) wurde auf eine Biogel P6-Säule (0,9 x 94 cm) aufgetragen. Durchflußgeschwindigkeit: 1,5 ml/h; Fraktionsvolumen: 0,6 ml; Puffer: 10% HAC;

2. Inkubationsansatz
Eglin-Chymotrypsin
(283 mIU)

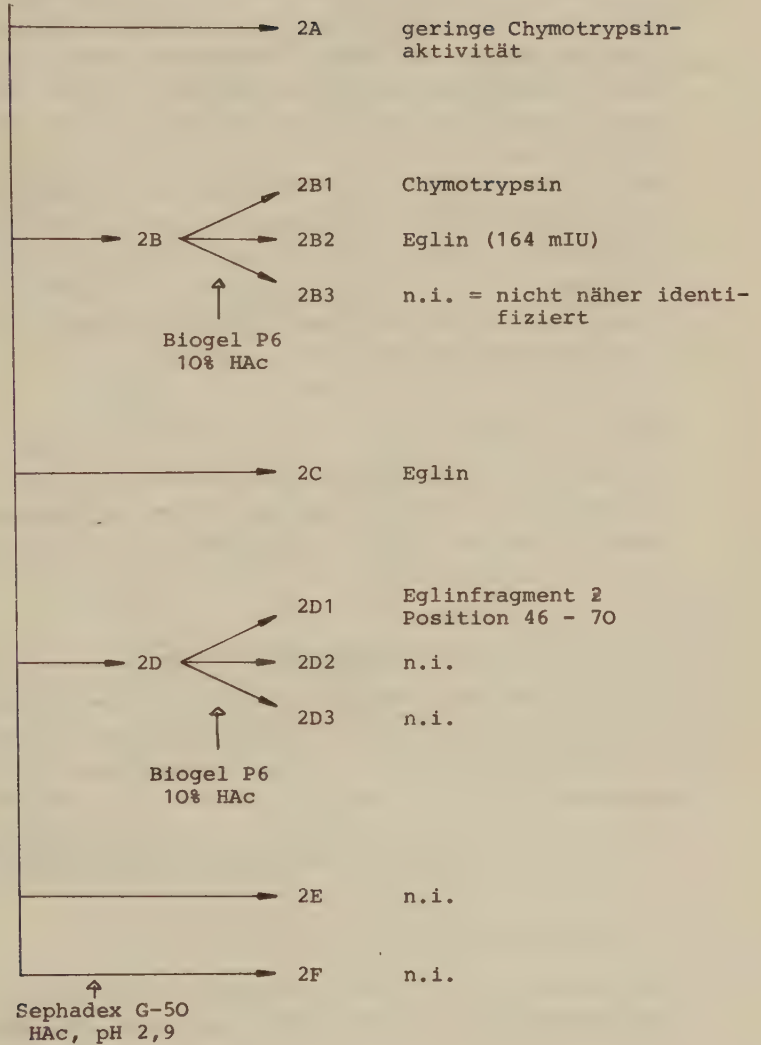


Abb.16 Isolierungsschema des 2. Inkubationsansatzes

D.4. Charakterisierung der Eglinfragmente

D.4.1. Aminosäurenanalyse

Das in der Fraktion 1B3 enthaltene Peptid wurde als Eglinfragment 1 bezeichnet. Als N-terminale Aminosäure fand sich Thr. Die Aminosäurenanalyse ergab eine Übereinstimmung mit der Aminosäurenzusammensetzung der Position 1 - 45 des Eglin c-Moleküls, die Ausbeute betrug 60 nMol.

Die Aminosäurenanalyse der Fraktion 1B4 (40 nMol) aus dem 1. Inkubationsansatz und 2D1 (90 nMol) aus dem 2. Inkubationsansatz ergab fast identische Werte und ermöglichte eine Zuordnung zur Aminosäurenzusammensetzung der Position 46 - 70 des Eglin c-Moleküls. Als N-terminale Aminosäure dieses als Eglinfragment 2 bezeichneten Peptids wurde Asp gefunden.

D.4.2. Aufklärung des reaktiven Zentrums

Als Spaltstelle der zwei Eglinfragmente wurde die Leu-Asp-Bindung in Position 45 - 46 identifiziert. Diese Bindung konnte somit als Peptidbindung des reaktiven Zentrums für Chymotrypsin identifiziert werden (s. Diskussion).

D.4.3. Sequenz von Eglinfragment 2

Fraktion 1B4 und 2D1 wurden vereinigt und am Institut für Hämatologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, München (Dr. Eulitz) sequenziert. Die Sequenzanalysen führte zu folgendem Ergebnis:

46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61
-Asp-Leu-Arg-Tyr-Asn-Arg-Val-Arg-Val-Phe-Tyr-Asn-Pro-Gly-Thr-Asn-
62 63 64 65 66 67 68 69 70
Val-Val-Asn-His-Val-Pro-His-Val-Gly-COOH

Damit konnte die Aminosäurenanordnung der bis dahin noch fraglichen Positionen 48 - 53 aufgeklärt werden (s. Diskussion und Tab.5).

Tab.4 Aminosäurezusammensetzung der Eglinfragmente

Fraktion	Eglinfragment 1		Eglinfragment 2			Eglin c
	1B3	AS/Mol ^a	1B4	2D1	AS/Mol ^a	AS/Mol
Asp	2,1	2	3,57	3,58	4; (5)	7
Thr	3,52	4	1,03	1,06	1	5
Ser	2,82	3	0,54	0,67	(0) - 1	3
Glu	6,4	6- (7)	0,95	0,98	1; (0)	7
Pro	3,8	4	1,7	1,7	2	6
Gly	3,06	3	1,9	1,93	2	5
Ala	1,02	1	0,24	0,44	0	1
Val	3,93	4; (5)	3,65	3,53	4; (6)	11
Leu	3,95	4	1,04	1	1	5
Tyr	2,1	2-3; (4)	1,2	1	1- (2)	3
Phe	3,64	4	1	0,92	1	5
His	1,0	1	1,37	1,32	1- (2)	3
Lys	1,98	2	0,45	0,61		2
Arg	1,0	1	1,98	1,87	2; (3)	4
Gesamt	45		25			70
Mr	5 190		2 928			8 099
Ausbeute	60 nMol		40 nMol 90 nMol			
Position	1 - 45		46 - 70 46 - 70			
N-Terminus	Thr		Asp Asp			Thr

^aWerte in Klammern aus dem Ergebnis der Sequenzierung des nativen Eglins ermittelt;

Hydrolyse 20 Stunden in 5,7 M HCl

Tab.5 Sequenzierung des Eglinfragmentes CH 1 (Position 46 - 70)
100 nMol eingesetzt

Schritt	Amino- säure	Ausbeute nMol	Identi- fizierung	Quanti- fizierung
1	Asp	6	Dc	Gc
2	Leu	41,6	Dc	Gc
3	Arg	14		Rh
4	Tyr	42	Dc	Gc
5	Asn	23	Dc	Gc, Rh
6	Arg	11		Th
7	Val	38	Dc	Gc
8	Arg	7		Rh
9	Val	29	Dc	Gc
10	Phe	20	Dc	Gc
11	Tyr	22	Dc	Gc
12	Asn	14	Dc	Gc, Rh
13	Pro	11	Dc	Gc
14	Gly	9	Dc	Gc
15	Thr	10	Dc	Gc, Rh
16	Asx	5		Gc, Rh
17	Val	9	Dc	Gc
18	Val	11	Dc	Gc
19	Asx	4	Dc	Rh

Repititive Ausbeute: 90,3%

Gc Gaschromatographie

Rh Rückhydrolyse

Dc Dünnschichtchromatographie

E. DISKUSSION

E.1. Zum Hemmechanismus von Eglin c

Inhibitoren stellen Substrate für die von ihnen inhibierten Enzyme dar; allerdings weisen sie gegenüber "guten" Substraten zwei entscheidende Unterschiede auf:

1. Der sich bildende Enzym-Inhibitor-Komplex ist sehr stabil; die energetische Situation zur Ausbildung des Komplexes ist durch die optimale Anpassung von Enzym- und Inhibitor-Struktur außerordentlich begünstigt, so daß die Weiterreaktion zum Acylenzym nur bedingt erfolgt.
2. Der im reaktiven Zentrum nach substratanaloger Proteolyse gesplattene Inhibitor ist ebenfalls hemmaktiv, die Spaltung also reversibel.

Das Fehlen von Cystein bzw. Cystin im Eglinmolekül ist ein außergewöhnliches Charakteristikum für niedermolekulare Protein-Proteinase-Inhibitoren. Die kovalente Fixierung der Struktur durch Disulfidbrücken wird als Ursache für ihre Stabilität gegen Denaturierung und im Zusammenhang mit ihrer biologischen Funktion diskutiert.

Von U. Seemüller wurden deshalb Untersuchungen zur Aufklärung des Hemmechanismus durchgeführt (s. B.5.). Bei diesen ersten Experimenten wurde folgende Beobachtung gemacht:

Bei der Interaktion zwischen Eglin und Chymotrypsin erfolgt eine limitierte Proteolyse unter Abspaltung eines Peptids (Eglinfragment 2), das nach SDS-elektrophoretischer Auftrennung (Abb.1) des Inkubationsansatzes dargestellt werden konnte.

Aus den Versuchen wurde folgender Hemmechanismus abgeleitet:

1. Eglin + Chymotrypsin $\xrightleftharpoons[\text{Proteolyse}]{\text{limitierte}}$ Eglinfragment 1-Chymotrypsin-Komplex + Eglinfragment 2
2. Eglinfragment 1-Chymotrypsin-Komplex $\longrightarrow$ Eglinfragment 1 + Chymotrypsin

Eglinfragment 1	$(\text{NH}_2\text{-P}_x\text{-P}_1\text{-COOH})$	N-terminales Fragment
Eglinfragment 2	$(\text{NH}_2\text{-P}_1'\text{-P}_x'\text{-COOH})$	C-terminales Fragment

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte die stattgefundene limitierte Proteolyse durch die Identifizierung des abgespaltenen Bruchstückes (Eglinfragment 2) sowie des modifizierten Inhibitors (Eglinfragment 1) bestätigt werden.

Um die Besonderheit der Eglin-Chymotrypsin-Interaktion zu verdeutlichen, sei zunächst der Standard-Hemmechanismus kurz erläutert (vgl. B.2.): Enzym und Inhibitor reagieren zum Komplex (C), in dem alle katalytischen Funktionen des Enzyms gehemmt sind. Der Komplex kann in substratanaloger Weise zum Acylenzym (A) unter Spaltung der Peptidbindung $\text{P}_1\text{-P}_1'$ im reaktiven Zentrum des Inhibitors weiterreagieren; nach Dansylierung entsteht sodann der modifizierte Inhibitor (I^+). Diese Reaktion ist reversibel, nativer und modifizierter Inhibitor stehen in einem thermodynamischen Gleichgewicht.

Die Interaktion zwischen Eglin und Chymotrypsin folgt prinzipiell derselben Reaktion; jedoch erscheint als Produkt dieser Reaktion ein in der SDS-Elektrophorese stabiler Komplex. Das simultane Auftreten eines niedermolekularen Peptids ist ein Indiz für die erfolgte limitierte Proteolyse der $\text{P}_1\text{-P}_1'$ -Bindung des reaktiven Zentrums im Inhibitmolekül; bei dem in der SDS-Elektrophorese

auftretenden Komplex muß es sich folglich um einen Acylenzym-Komplex handeln.

Da das durch limitierte Proteolyse entstehende Eglinfragment nicht kovalent über Disulfidbrücken assoziiert ist, sollte man die Abspaltung dieses Peptids erwarten. Der im Komplex verbleibende modifizierte Inhibitor wäre ein C-terminal verkürztes Eglin, die Reversibilität der Reaktion, wie sie für die sog. Standardinhibitoren beschrieben ist, fraglich.

Die vorliegende Arbeit sollte zur Charakterisierung des Komplexes, zur Aufklärung des Hemmechanismus sowie zur Charakterisierung des in der SDS-Elektrophorese dargestellten, niedermolekularen Peptids beitragen.

E.2. Zu den experimentellen Ergebnissen

Die Isolierung und Charakterisierung von Eglin b und c wurde nach derselben Methode durchgeführt, wie sie von U. Seemüller beschrieben ist (21). Dabei konnten die experimentellen Ergebnisse, soweit sie nachvollzogen wurden, bestätigt werden.

Bei der vorliegenden Arbeit stellte sich das Problem, die Ergebnisse der SDS-elektrophoretischen Auftrennung des Eglin-Chymotrypsin-Inkubationsansatzes auf das säulenchromatographische Trennverfahren zu übertragen.

Der Vergleich der Ergebnisse aus SDS-Elektrophorese und der hier durchgeführten gelchromatographischen Trennung ergibt zwei wesentliche Unterschiede:

1. Während unter den Bedingungen der SDS-Elektrophorese Komplex und Eglinfragment 2 etwa in äquimolarer Menge zum eingesetzten Chymotrypsin gefunden werden, ist die Ausbeute an Eglinfragment 2 mit ca. 14% bzw. 22% bezogen auf die eingesetzte

Chymotrypsinmenge in den beiden chromatographischen Trennungen gering.

2. In der SDS-Elektrophorese kommt es zu keiner Dissoziation des Komplexes in Chymotrypsin und modifizierten Inhibitor (Eglinfragment 1). Diese Dissoziation erfolgt jedoch bei der säulenchromatographischen Auftrennung des Inkubationsansatzes in 10% Essigsäure, nicht aber mit 0,6% Essigsäure.

Zur Erklärung der dargestellten Phänomene bzw. der Ergebnisse seien die Trennbedingungen der beiden Inkubationsansätze näher diskutiert:

Die Konzentration bzw. das molare Konzentrationsverhältnis von Enzym und Inhibitor, sowie die unterschiedliche Inkubationszeit dürften keinen Einfluß auf die abweichenden Resultate der beiden Trennverfahren haben. Entscheidend scheint vielmehr der pH-Wert zu sein.

Für die Auftrennung des 1. Inkubationsansatzes wird folgender Reaktionsmechanismus formuliert:



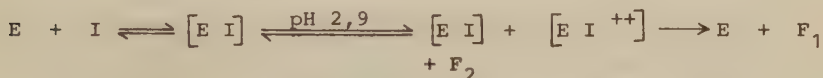
Dabei bedeutet: $[E I^+] = \text{Chymotrypsin}$ Eglinfragment 1 (kovalent)
Eglinfragment 2 (nicht ko-
valent)

Der Enzym-Inhibitor-Komplex wird in der alkalischen Auftrennung in zwei verschiedenen Formen eluiert: In Fraktion 1A als Komplex, der im Säuren in Chymotrypsin und Eglin dissoziiert; in Fraktion 1B als Komplex, der in Chymotrypsin, natives Eglin, Eglinfragment 1 und Eglinfragment 2 dissoziiert.

In Fraktion 1C findet man den Eglinüberschuß, in Fraktion 1D und 1E niedermolekulare, nicht identifizierbare Peptide (Chymotrypsinautolyse, Eglinabbauprodukte?).

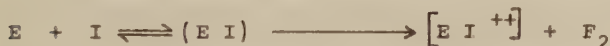
Bei der Auftrennung des 2. Inkubationsansatzes bei pH 2,9 tritt der Komplex ebenfalls in zwei Formen auf: Als Acylenzym-Komplex (Chymotrypsin-Eglinfragment 1 = $E I^{++}$) in Fraktion 2A und als "intakter" Komplex in Fraktion 2B, der sich in 10% HAc in Chymotrypsin und Eglin auftrennt. Der Eglinüberschuß wird in Fraktion 2C gefunden. Eglinfragment 2 (in Fraktion 2D) ist hier offenbar bereits im 1. Trennschritt bei pH 2,9 abdissoziiert.

Es wird folgender Mechanismus formuliert:



Dabei bedeutet: $[E I^{++}]$ = Chymotrypsin-Eglinfragment 1 (kovalent)

Für die Bedingungen der SDS-Elektrophorese läßt sich folgender Mechanismus formulieren:



Aus den dargestellten Beobachtungen läßt sich folgern:

Bei der Interaktion zwischen Eglin und Chymotrypsin kann es zu einer limitierten Proteolyse kommen. Diese findet unter bestimmten Voraussetzungen wie sie z.B. in der SDS-Elektrophorese herrschen, statt. Unter den in dieser Arbeit gewählten Bedingungen erfolgt die limitierte Proteolyse nur zu einem geringen Maße. Dies erklärt die relativ geringe Ausbeute an Eglinfragment 2 bzw. modifiziertem Inhibitor. Die Dissoziation von Eglinfragment 2 und modifiziertem Inhibitor erfolgt nur im sauren Medium.

E.3. Reaktives Zentrum, Vergleich mit anderen Proteinase-Inhibitoren

Das reaktive Zentrum enthält eine spezifische, labile Peptidbindung, die in der Interaktion mit dem hemmbaren Enzym spezifisch von diesem gespalten werden kann (24).

Bei der Interaktion von Eglin mit Chymotrypsin führt die limitierte Proteolyse zur Bildung von im wesentlichen zwei Inhibitorfragmenten:

 einem N-terminalen Fragment (Position 1 - 45)

 einem C-terminalen Fragment (Position 46 - 70)

Wir folgern daraus, daß bei der Interaktion mit Chymotrypsin spezifisch nur die Peptidbindung 45 - 46 gespalten wurde und somit diese Bindung Leu-Asp das reaktive Zentrum darstellt.

Svendsen et al. verglichen Chymotrypsin-Inhibitoren aus Gerste (CI-1 und CI-2), der Kartoffel (PI-1) und Eglin aus dem Blutegel (LIE) (34 - 36). CI-1 und CI-2 enthalten wie Eglin kein, der Kartoffelinhibitor 1 mit nur einer Disulfidbrücke ebenfalls ungewöhnlich wenig Cystin. Ebenfalls verglichen mit dieser "Familie von Cystin-unabhängigen Inhibitoren" wurde der Proteinase B-Inhibitor aus Hefe (YIB). Die Untersuchungen bezogen sich auf Vergleiche in der Aminosäuresequenz, insbesondere auf Homologien im Bereich der reaktiven Zentren. Dabei wurden zwischen 11 und 46% identische Aminosäurepositionen gefunden (Tab.6).

Das reaktive Zentrum (P_1' - P_1) ist für PI-1 und Eglin aufgeklärt. Es findet sich die Bindung Met/Leu-Asp bzw. Leu-Asp für PI-1 bzw. Eglin, Met-Glu für CI-2 und Leu-Asn für CI-1 in den entsprechenden Positionen. Bemerkenswert ist auch die Übereinstimmung der Aminosäuren in der Umgebung des reaktiven Zentrums (Tab.7).

Tab.6 Übereinstimmung verschiedener Inhibitoren in Bezug auf die Aminosäuresequenz in identischen Positionen

Inhibitor	Übereinstimmung (%)			
	Hefe YIB	Blutegel LIE	Kartoffel PI-1	Gerste CI-2
CI-1	11	32	30	46
CI-2	11	35	40	
PI-1	16	38,6		
LIE	16			

Tab.7 Vergleich der Aminosäuresequenz verschiedener Inhibitoren im Bereich des reaktiven Zentrums

Inhibitor	Aminosäuresequenz im Bereich des reaktiven Zentrums							
	P ₄	P ₃	P ₂	P ₁	P ₁ '	P ₂ '	P ₃ '	P ₄ '
CI-1	Met	Val	Pro	Leu	Asn	Phe	Asn	Pro
CI-2	Ile	Val	Thr	Met	Glu	Tyr	Arg	Ile
PI-1	Pro	Val	Thr	Met Leu	Asp	Tyr Phe Leu	Arg	Cys
LIE	Pro	Val	Thr	Leu	Asp	Leu	Arg	Tyr

E.4. Zur Sequenzaufklärung

Die Sequenzierung des Eglin c-Moleküls erfolgte durch das automatische Verfahren des sequentiellen Proteinabbaus sowohl des nativen Eglins, als auch seiner tryptischen Peptide. Die tryptische Spaltung ergab acht Peptide, $T_1 - T_8$, die zur weitgehenden Sequenzierung führten. Lediglich über die sequentielle Zuordnung der Peptide T_5 und T_6 (Position 48 - 53 im Eglin c-Molekül) konnte keine Aussage gemacht werden. Das im Rahmen dieser Arbeit isolierte und gereinigte Eglinfragment 2 wurde sequenziert (Tab.5) und führte zur vollständigen Sequenzaufklärung der fraglichen Positionen des Eglin c-Moleküls.

F. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Laskowski, M., jr., R.W. Sealock (1971) in: The Enzymes Vol. III, 3rd Ed. (Ed. P.D. Boyer), pp 375, Academic Press, New York, London
- 2 Peeters, H. (Ed.) (1976) in: Protides of the Biological Fluids, Proceedings of the 23rd Colloquium, Pergamon Press, Oxford, New York
- 3 Laskowski, M., jr. W.R. Finkenstadt, J.A. Mattis, R.E. McKee in l.c. 2, pp 85
- 4 Quast, U., J. Engel, G. Mair, H. Tschesche in l.c. 2, pp.57
- 5 Schechter, I., A. Berger (1967) in: Biochem. Biophys. Res. Commun. 27, 157
- 6 Vogel, R., I. Trautschold, E. Werle (1968) in: Natural Proteinase Inhibitors, Academic Press, New York, London
- 7 Fritz, H., H. Tschesche (Eds.) (1971) in: Proceedings of the 1st International Research Conference on Proteinase Inhibitors, Walter de Gruyter, Berlin, New York
- 8 Fritz, H., H. Tschesche, L.J. Greene, E. Truscheit (Eds.) (1974) in: Proteinase Inhibitors, Proceedings of the 2nd International Research Conference on Proteinase Inhibitors, Bayer Symposium V, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- 9 Huber, R., W. Bode in: Structural Basis of the Activation and Action of Trypsin. Accounts of Chemical Research (1978) 11, 114 - 122
- 10 Ozawa, K., M. Laskowski, jr., (1966) in: J.Biol.Chem. 241, 3955
- 11 Schachter, M. in: Kallikreins (Kininogenases) - A Group of Serine Proteases with Bioregulatory Actions in Pharmacological Reviews Vol. 31, No. 1 (1980)

- 12 Davie, E.W., F. Fujikawa, K. Kurachi, W. Krisiel (1979) in: Adv.Enzymol. 48, 277
- 13 van Leuven, F. in: Human α_2 -macroglobulin: structure and function, TIB5 5/82, 185 (1982)
- 14 Sottrup-Jensen, L., P.B. Lonblad, T.M. Stepanik, T.E. Petersen, S. Magnusson, H. Jornvall in: Primary structure of the "Bait" region for proteinases in α_2 -macroglobulin: Nature of the complex, FEBS Letters 127, 167 (1981)
- 15 Mortensen, S.B., L. Sottrup-Jensen, H.F. Hansen, T.E. Petersen, S. Magnusson in: Primary and secondary cleavage sites in the bait region of α_2 -macroglobulin, FEBS Letters 135, 295 (1981)
- 16 Petersen, T.E., H.R. Roberts, L. Sottrup-Jensen, S. Magnusson in l.c. 2, pp. 145
- 17 Dodt, J., H.-P. Müller, U. Seemüller, J.Y. Chang, Publikation in Vorbereitung
- 18 Fritz, H., M. Gebhardt, R. Meister, E. Fink (1971) in l.c. 7, pp 271
- 19 Lorand, L. (Ed.) (1976) in: Methods in Enzymology 45, Academic Press, New York, San Francisco, London
- 20 Seemüller, U., M. Meier, K. Ohlsson, H.-P. Müller, H. Fritz in: Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 358, 1105 - 1117 (1977)
- 21 Seemüller, U. (1979) in: Dissertationsschrift, Fachbereich Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilian-Universität München
- 22 Seemüller, U., M. Eulitz, H. Fritz, A. Strobl in: Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 361, 1841 - 1846 (1980)
- 23 Green, N.M., E. Work (1952) in: Biochem.J. 54, 347
- 24 Laskowski, M., jr., R.W. Sealock (1971) in: The Enzymes Vol. III 3rd Ed. (Ed. P.D. Boyer), pp 375, Academic Press, New York, London
- 25 Markwardt, F. (1956) in: Arch.Exp.Path.Pharmakol. 229, 389
- 26 Fritz, H., I. Trautschold, E. Werle (1974) in: Methoden der Enzymatischen Analyse (Ed. H.U. Bergmeyer), 3. Aufl., Bd.I, S. 1105 - 1121 u. S. 1038, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr.
- 27 Weber, K., M. Pringle, M. Osborn (1970) in: Meth.Enzymol. 26, 3

- 28 Maurer, H.R. (1971) in: Disc Electrophoresis, Walter de Gruyter, Berlin
- 29 Weber, K., M. Osborn (1975) in: The Proteins (H. Neurath, R.L. Hill, Eds.) Band I, S. 179 - 223, Academic Press, New York
- 30 Spackman, D.H., W.H. Moore (1958) in: Anal.Chem. 30, 1190
- 31 Gros, C.B., B. Labouesse in: Study of the dansylation reaction of amino acids, peptides and proteins, Eur,J.Biochem. 7, 463 - 470 (1969)
- 32 Green, N.M., E. Work (1952) in: Biochem.J. 54, 347 - 352
- 33 Udenfriend, S., S. Stein, P. Böhlín, W. Dairman, W. Leimgruber, M. Weigele (1972) in: Science 178, 871 - 872
- 34 Seemüller, U., H. Fritz, M. Eulitz in: Eglín: Elastase-Cathepsin G inhibitor from leeches, Meth.Enzymol. 80, 804 - 816 (1981)
- 35 Svendsen, I., S. Boisen, J. Hejgaard in: Amino Acid Sequence of Serin Protease Inhibitor CI-1 from Barley. Homology with Barley Inhibitor CI-2, Potato Inhibitor I, and Leech Eglín. Carlsberg Res.Comm. 47, 45 -53 (1982)
- 36 Svendsen, I., I. Jonassen, J. Hejgaard, S. Boisen in: Amino Acid Sequence Homology between a Serine Protease Inhibitor from Barley and Potato Inhibitor I. Carlsberg Res.Comm. 45, 389 - 395 (1980)

Lebenslauf

Name:	Anton Strobl
Geburtstag:	25.1.1953
Geburtsort:	Deining, Kreis Wolfratshausen
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
Schulbildung:	1959 - 1965 Volksschule in Großding- harting 1965 - 1974 Humanistisches Gymnasium in Pfarrkirchen
Studium:	1974 - 1981 Medizinstudium an der Lud- wig-Maximilians-Universität in München
Approbation:	23.6.1981
Wehrdienst:	1.9.1981 - 30.11.1982; ab 1.10.1981 als Truppenarzt beim PzGrenBtl 222 in Murnau
Beruf:	Seit 1.3.1983 Assistenzarzt in der Chi- rurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Pfarr- kirchen

